

# Структура и биологическая активность фуллерена (обзор)

## *Введение*

Фуллерен представляет собой единственно известную молекулярную форму углерода, являясь его аллотропной разновидностью наряду с известными формами – графитом, алмазом, карбином, графеном и углеродными нанотрубками. Его открытие состоялось в 1985 году, микроскопические количества фуллерена были получены исследователями, путем лазерного испарения графита в пульсирующей струе гелия, которые показали масс-спектрометрией, что большинство молекул паров графита состоят из 60 атомов углерода ( $C_{60}$ ) [1]. Свое название фуллерены получили благодаря американскому инженеру и дизайнеру Р. Бакминстеру Фуллеру, в чьих конструкциях используется замкнутая форма, состоящая из правильных пятиугольников и шестиугольников. За открытие фуллеренов в 1996 году Г. Крото (Англия), Р. Смолли и Р. Керлу (оба США) была вручена Нобелевская премия по химии.

В 1990 г В. Кретчмером и Д. Хаффманом был разработан препаративный способ получения фуллерена, в котором использовался электродуговой разряд в парах графита в разреженной инертной атмосфере [2]. Сообщение о таком простом и недорогом методе получения уникального вещества, вызвало настоящий бум и послужило толчком к масштабным исследованиям свойств нового материала и возможностей его применения в различных областях науки и техники. Сейчас ежегодно в мире регистрируется сотни патентов, тысячи публикаций, посвященным методам получения, структуре и свойствам фуллеренов и их производных, в том числе связанных с практическим применением.

К уникальным параметрам фуллерена и некоторых его производных можно отнести мощную электронно-акцепторную активность, высокую поляризуемость молекулы, наличие большого числа эквивалентных реакционных центров и гидрофобность. Последнее свойство, по-видимому, имеет отношение к их способности проникать через биологические мембраны. Большая поверхность  $C_{60}$  и хорошо разработанная химия фуллерена позволяет присоединять к сферической молекуле различные гидрофильные адденды, создавать поливалентные структуры, что представляет интерес для конструирования новых биопрепаратов.

С начала открытия препаративного способа получения фуллерена, были синтезированы многие сотни его производных с обширным спектром биологической активности: противоопухолевой [3], антивирусной [4, 5], антимикробной [6], антиоксидантной [7], нейропротективной [8, 9], фотодинамической [10, 11],

мембранотропной [12, 13], ингибиторы ферментов, блокаторы апоптоза и как радиопротекторы. Все это говорит о том, что фуллерен, как основа, является перспективным материалом для создания новых высокотехнологичных медицинских материалов и лекарственных препаратов [14].

### ***Физические свойства фуллерена***

Фуллерен – абсолютно симметричная молекула, имеющая сферическую форму и диаметр 0,7 нм, содержащая 60 атомов углерода, которые расположены в вершинах правильных 12 пятиугольников и 20 шестиугольников на поверхности усеченного икосаэдра (Рис.1) [15]. Из всех аллотропных форм углерода это единственная, существующая в виде отдельных молекул, все ее атомы находятся на поверхности при отсутствии свободных валентностей. По существу, фуллерен занимает промежуточное положение между органической и неорганической материей.

Поскольку в фуллерене каждый атом углерода находится в вершинах двух шестиугольников и одного пятиугольника, все его атомы эквивалентны. Каждый шестиугольник граничит с тремя шестиугольниками и тремя пятиугольниками, а каждый пятиугольник граничит только с шестиугольниками. Эквивалентность атомов подтверждается спектром ядерного магнитного резонанса (ЯМР) изотопа  $^{13}\text{C}$  – спектр фуллерена содержит всего один пик. Однако связи между углеродами в фуллерене имеют разную длину, двойная связь  $\text{C}=\text{C}$ , являющаяся общей стороной для двух шестиугольников, составляет 1.39 Å, а одинарная связь  $\text{C}-\text{C}$ , общая для шести- и пятиугольника, длиннее и равна 1.44 Å.

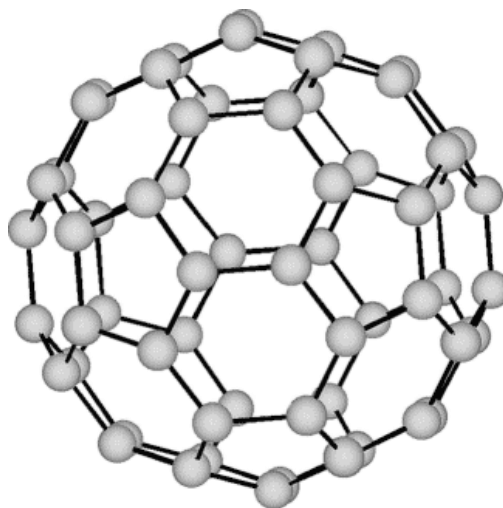


Рисунок 1.1 – Модель молекулы фуллерена  $\text{C}_{60}$ .

Еще одна необычная структурная особенность фуллерена заключается в том, что его молекула имеет внутреннюю полость, диаметр которой приблизительно 5 Å, толщина

его сферической оболочки составляет около 1Å. В кристалле молекулы фуллерена не связаны ковалентно, что разительно отличает их от всех других известных веществ. Основные физические свойства приведены в таблице 1.1.

Таблица 1.1 – Физические свойства фуллерена

Открыт	1985 г
Нобелевская премия	1996 г
Метод получения	Конденсация паров графита в инертной атмосфере
Внешний вид кристаллов (фуллерит)	Черный порошок
Молекулярная масса	720
Диаметр молекулы	0.7 нм
Растворимость в воде	<10–11 г/л
<sup>13</sup> C ЯМР	143 ppm
ИК-спектр	1428, 1182, 577 и 528 см <sup>-1</sup>
Плотность	1,72 г/см <sup>3</sup>
Точка кипения	Сублимируется при 800°K
Удельное сопротивление	1014 Ом/м
Нахождение в природе	Космос, на Земле следовые количества
Мировой масштаб производства	Тонны
Цена за 1 г (2017 г)	500-2500 руб (зависит от чистоты)
Уникальные физические свойства	Сильный акцептор электронов, высокая поляризуемость, абсолютная симметрия
Перспективы в медицине	Антиоксидант, радиопротектор, противовоспалительные средства (аллергия, дерматит, астма) фотодинамическая терапия рака

Кристаллический фуллерен, или фуллерит, имеет прямоугольную кубическую, или гранецентрированную кубическую кристаллическую решетку. Между молекулами C<sub>60</sub> в кристалле фуллерита существует слабое Ван-дер-Ваальсовское взаимодействие. Методом

ЯМР доказано, что при комнатной температуре молекулы  $C_{60}$  вращаются вокруг положения равновесия с частотой  $1012\text{ с}^{-1}$ , при понижении температуры вращение замедляется, и при  $-24^\circ\text{C}$  в фуллерите наблюдается фазовый переход, при котором его объем увеличивается на 1%. Кристаллы фуллерита имеют плотность  $1,72\text{ г/см}^3$ , что значительно меньше плотности графита ( $2,3\text{ г/см}^3$ ) и алмаза ( $3,5\text{ г/см}^3$ ). Молекула  $C_{60}$  сохраняет свою стабильность в инертной атмосфере вплоть до температур порядка  $1200\text{--}1300^\circ\text{C}$ , но в присутствии кислорода при температурах более  $200^\circ\text{C}$  наблюдается значительное окисление с образованием угарного и углекислого газа. При облучении светом окисление проходит уже при комнатной температуре, поэтому фуллерены необходимо хранить в темноте. Процесс, продолжающийся несколько часов, приводит к разрушению решетки и образованию неупорядоченной структуры, в которой на исходную молекулу  $C_{60}$  приходится до 12 атомов кислорода. На ранней стадии исследований свойств фуллерена исследователи предполагали, что он должен быть химически неактивным и относительно стабильным. Однако было доказано, что он может участвовать во многих химических реакциях. Одно из самых замечательных свойств – фуллерен оказался мощным акцептором электронов в присутствии многих органических и неорганических доноров [16]. Это связано с его высокой электродефицитностью, в химических реакциях он ведет себя как окислитель, и способен присоединять к себе до шести электронов.

### ***Химические свойства***

Для фуллерена основным типом химических превращений являются реакции по двойной связи – реакции нуклеофильного и радикального присоединения, циклоприсоединения. Такие реакции очень удобны для получения производных фуллерена, большинство образующихся в результате этих процессов аддуктов имеют достаточную стабильность, и это позволяет применять дальнейшие химические модификации для создания новых биологически активных веществ. Функционализированные фуллерены делятся на два класса: экзоэдральные – с заместителями на внешней поверхности и эндоэдральные – с захваченными молекулами внутри полости фуллерена. Экзоэдральные соединения являются доминирующим классом.

*Реакции нуклеофильного присоединения.* Электрофильные двойные связи  $C_{60}$  легко и охотно присоединяют различные нуклеофилы и радикалы. Этот тип присоединения был обнаружен самым первым среди различных химических превращений  $C_{60}$  [17]. Часто используемые реакции присоединения аминов протекают достаточно сложно и

неоднозначно. Факты свидетельствуют о том, что реакция идет по радикальному механизму, и в присутствии кислорода происходит окисление фуллерена.

*Циклоприсоединение.* Эти реакции – наиболее распространенные в химии фуллерена, и известные в органической химии как диеновый синтез (реакция Дильса-Альдера), где  $C_{60}$  всегда выступает в роли диенофила. Большое количество разнообразных диенов было введено во взаимодействие с фуллереном и в большинстве случаев отмечено образование моноаддуктов. Универсальность этой реакции явилась сильным стимулом для исследователей, она позволяла вводить в ядро  $C_{60}$  практически любые функциональные группы.

*Гидроксилирование.* Фуллерены могут присоединять гидроксильные группы с образованием фуллеренолов, или фуллеролов. Хотя их гидрофильность повышена, растворимость в воде зависит от общего количества присоединенных гидроксильных групп. Одним из популярных методов получения фуллеролов является реакция со щелочью (NaOH), катализируемая тетрабутиламмоний-гидроксидом, в результате к фуллерену присоединяется от 24 до 26 OH-групп, при этом их максимальное количество, которое может быть присоединено к фуллерену этим методом, составляет 36-40.

Поскольку фуллерен способен эффективно принимать и отдавать электроны, он может служить хорошим катализатором, но при этом он чувствителен к кислороду, окисление особенно активизируется при облучении светом с образованием оксидов. Поэтому, растворы фуллерена рекомендуется хранить в темноте, или работать с ними в инертной атмосфере.

### ***Получение водных растворов (дисперсий)***

Первые же исследования показали, что фуллерены плохо растворяются в большинстве растворителей, они практически нерастворимы в полярных растворителях (спирты, ацетон, тетрагидрофуран) и малорастворимы в нормальных алканах (пентан, гексан, декан) [18]. Лучше всего они растворимы в сероуглероде и ароматических неполярных растворителях, например, известен ряд (в порядке уменьшения растворимости): сероуглерод, толуол, бензол, тетрахлорметан, декан, гексан, пентан [19]. С некоторыми полярными растворителями фуллерен образует донорно-акцепторные комплексы (комплексы с переносом заряда), например с N-метилпирролидоном, пиридином, третичными аминами, т. е. с так называемыми *реактивными растворителями* [20].

Проблема растворимости фуллерена стоит особенно остро в связи с его потенциальным применением в медицине, в водной среде он практически нерастворим ( $<10^{-11}$  г/л) [21], что обусловлено его высокой гидрофобностью в сочетании с тенденцией

к образованию агрегатов. В настоящее время имеется большой пласт работ, посвященных этой проблеме, и решают ее, в основном, тремя путями: прямым получением водных коллоидных дисперсий фуллерена, созданием комплексов фуллерена с гидрофильными соединениями и присоединением к нему гидрофильных групп.

Свободный фуллерен, при его специальной обработке, способен к образованию стабильных коллоидных растворов [20-25]. Большинство методов их получения основано на переносе фуллерена из органического раствора в водную фазу с применением интенсивной ультразвуковой обработки, что приводит к разогреванию такой смеси, постепенному испарению органического растворителя и переходу сформированных наночастиц фуллерена в водную фазу. Иногда используют постепенный переход, повышая гидрофильность среды: толуольный раствор фуллерена сначала смешивают со спиртом (или тетрагидрофураном), а затем с водой. Как альтернатива испарению под действием ультразвука используют либо вакуумное упаривание, либо продувку смеси инертным газом. Обычно, в результате образуется стабильный коллоидный раствор желтого цвета, содержащий гидратированные кластеры из молекул  $C_{60}$ , размер которых зависит от особенностей метода и колеблется в широком диапазоне. Мощность ультразвуковой системы и режим обработки играет значительную роль, оказывая влияние на размер частиц и побочные процессы.

Еще один способ, который иногда используют, чтобы исключить применение токсичных растворителей – многомесячное перемешивание на магнитной мешалке предварительно тонко растертой суспензии фуллерита в чистой воде [26]. Однако такой способ приводит к дисперсии с очень низкой концентрацией фуллерена. Фуллерен, как в водных, так и во многих органических средах, всегда собирается в кластеры, что, по сути, является «формой его существования». Вообще, способность образовывать ассоциаты за счет донорно-акцепторных связей со многими органическими растворителями, в том числе и с водой, является специфической особенностью фуллерена.

Другой способ перевода фуллерена в водорастворимую форму основан на образовании комплексов с амфифильными веществами. Амфифильные полимеры, в том числе и белки, способны образовывать нековалентные ассоциаты с  $C_{60}$ , растворимые в воде. В этом качестве наибольшую популярность приобрел биосовместимый полимер – поливинилпирролидон (ПВП). При комплексовании он образует желто-коричневый раствор с содержанием фуллерена по отношению к ПВП 0,5-1% в зависимости от молекулярной массы ПВП [27, 28]. Фуллерен можно также перевести в раствор при кипячении фуллерита с водным раствором  $\gamma$ -циклодекстрина (ЦД) при мольном соотношении  $C_{60}$ :ЦД=1:2. Внутри комплекса он может находиться в свободной или

гидратированной формах. И хотя такой комплекс можно подвергать гелепроникающей хроматографии, он все же медленно распадается, и в среде всегда будут находиться в равновесном состоянии свободные компоненты [29]. Еще одна методика основана на образовании Ван-дер-ваальсовых комплексов с амфифильными молекулами, например с поверхностно-активными веществами и липосомами [30].

Необходимо подчеркнуть, что относительно низкая степень перевода фуллерена из кристаллического состояния в раствор и необходимость длительного перемешивания/ультразвуковой обработки (подробности обработки часто не сообщаются) делают эти методы плохо воспроизводимыми и не экономичными. Кроме того, обработка ультразвуком, используемая для ускорения растворения  $C_{60}$ , часто приводит к нежелательным процессам, окислению, образованию агрегатов [31]. Используемые для солюбилизации ароматические растворители являются токсичными веществами, и нет полной уверенности, что они целиком удаляются из дисперсии ввиду их специфического ( $\pi$ -стекинг) взаимодействия с фуллереном [32, 33]. Например, толуол прочнее связывается с фуллереном по сравнению с бензолом, а из-за следов токсичного тетрагидрофурана в такой дисперсии, делалось ошибочное заключение о токсичности самого фуллерена [34].

Необходимо также отметить, что в настоящее время коммерчески доступен лишь один продукт такого рода, раствор гидратированного фуллерена  $C_{60}$  (FWS), разработанный д-ром Андриевским (Институт физиологически активных веществ, Харьков, Украина, <http://www.ipacom.com/index.php/ru/products-left/88>). Данный продукт имеет очень высокую цену – 1 мл, содержащий 144 мкг фуллерена, стоил \$500 (цены 2012 г), тогда как цена 1 мг чистого кристаллического фуллерена не выше 10 центов.

Все фуллерен-содержащие водные растворы (коллоидные дисперсии) обычно имеют цвет от желтого до красно-коричневого в зависимости от концентрации, такие дисперсии могут содержать как единичные гидратированные молекулы фуллерена, так и их кластеры с размерами от 2 до 1000 нм. Такие дисперсии в различных публикациях обозначаются по-разному:  $nC_{60}$ ,  $n\text{apo-}C_{60}$ ,  $C_{60}\text{FWS}$ ,  $C_{60}@ \{H_2O\}_n$ , молекулярно-коллоидный фуллерен (МКФ), гидратированный фуллерен (ГФ или  $H_nFn$ ). Наличие отрицательного заряда на поверхности кластеров играет важную роль в стабилизации водных дисперсий фуллерена, изменение pH, и особенно, ионной силы, приводит к агрегации кластеров и осаждению фуллеренового материала. Следует добавить, что высушенные дисперсии  $C_{60}$  обычно необратимо теряют растворимость в воде.

### ***Анализ токсичности***

Учитывая стремительное развитие нанотехнологий, человек, животные и другие биологические объекты могут находиться в тесном контакте с наноматериалами, поэтому

проблема их безопасности и оценка потенциальных рисков представляется первостепенной задачей. По классификации наноматериалов к основным их типам относят углеродные наночастицы: фуллерены, нанотрубки, графен, углеродные нанопористые материалы. Все эти вещества начинают активно использоваться в промышленности и являются ксенобиотиками. Организм может реагировать непосредственно на сам ксенобиотик, либо на его комплекс с антигенами организма (аддукты с белками и другими биомолекулами), при этом токсичность может проявляться в виде аллергии, астмы, атопического дерматита или аутоиммунного заболевания. Очевидно, что важную роль играет способность наноматериалов распознаваться иммунной системой, взаимодействовать с белками хозяина, проходить через клеточные мембраны и гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), подвергаться биодеструкции, персистировать или выводиться из организма. Следует подчеркнуть, что необходимо различать токсичность, связанную непосредственно с фуллереновым сфероидом и токсичность, опосредованную модификацией этой молекулы, т. е. по существу, вызванной присоединяемыми группировками. Функционализация  $C_{60}$  с целью повышения его гидрофильности и снижения токсичности существенно влияет на характер его взаимодействия с биологической системой [35]. Введение функциональных групп может нивелировать антиоксидантную активность фуллерена, т. е. резко изменить его характерные свойства.

Химическая модификация фуллерена оказывает значимое влияние на токсичность. Например, величина  $LD_{50}$  фуллерола при внутрибрюшинном введении мышам составляла 1,2 г/кг [36]. Аналогичное введение мышам аминокислотного производного  $C_{60}$ -Ser в дозе 80 мг/кг не оказывало никакого влияния на поведение и жизнеспособность мышей [37]. В одной из первых работ по фармакокинетике изучались эффекты внутривенного введения крысам препарата фуллерена бис(2-аминоэтил)-дифенилфуллерена, обладающего анти-ВИЧ активностью (ингибитор ВИЧ-протеазы). При введении 15 мг/кг среднее время персистенции препарата в плазме составляло ~7 часов, причем более чем на 99 % он был связан с белками плазмы. При этой дозе вещество хорошо переносилось животными, но при 25 мг/кг у них наблюдалось учащенное дыхание, резкие движения и гибель через 5 мин. Интересно, что токсические эффекты не наблюдались, когда тот же самый препарат вводили мышам внутрибрюшинно (в/б) в дозе 50 мг/кг в течение 6 дней [38]. Между тем, изучение токсичности водорастворимого полиалкилсульфонилфуллерена показало, что оно нетоксично при пероральном введении, а при в/б введении его  $LD_{50}$  составляло 600 мг/кг (выводится вещество через почки) [39].



Обычно при внутривенном введении производные фуллерена очень быстро выводятся из кровотока и накапливаются в печени и других органах, при этом практически не удается обнаружить их следы в моче и фекалиях. При пероральном введении, напротив, лишь следы обнаруживаются в печени через 6 ч., в то время как около 90 % экскретируется, а в моче обнаруживаются лишь следы. Например, сукцинильное производное фуллерена введенное крысам внутривенно, быстро распределялось по всем органам. При этом оно удерживалось в тканях около недели без серьезных токсических эффектов. При пероральном же введении наблюдалась его быстрая элиминация с экскрементами [40]. Испытания гидроксильированного фуллерена, фуллерола, показали, что при его внутрибрюшинном введении мышам и крысам LD<sub>50</sub> составляло 0,5–2,4 г/кг [41]. При этом показано (*in vivo*), что фуллеролы могут снижать уровень микросомальных ферментов и уменьшать активность P<sub>450</sub>-зависимой монооксигеназы.

Биологические эффекты водорастворимых форм фуллерена зависят от различных факторов: метода получения, получаемой структуры, степени агрегации его молекул в процессе хранения, формы введения. Поэтому, нельзя обсуждать токсичность фуллерена как вообще некоего вещества, необходимо учитывать вышеуказанные факторы, и принять, что его различные модификации/формы являются различными препаратами.

Несмотря на то, что фуллерены используются уже 20 лет, ни в одной из стран мира они не были изучены на безопасность в полном объеме. В то же время имеется масса публикаций, связанных с анализом отдельных проявлений их биологической активности в экспериментах *in vitro* и *in vivo*, из большинства которых следует, что серьезных токсических эффектов у фуллерена C<sub>60</sub> обнаружено не было. Первые работы по исследованию токсичности фуллерена появились уже в 1995-96 гг. [42, 43], и в них было показано, что при введении мышам фуллерена в дозе 2,5 г/кг, он не вызывал гибели мышей и побочных эффектов у животных при наблюдении в течение 8 недель. Отмечалось, что при внесении фуллерена в среду с культурой человеческих кератиноцитов или фибробластов наблюдается его довольно быстрое поглощение при отсутствии влияния на пролиферацию [44]. В то же время имеется достаточно много противоречивых данных — их сложно унифицировать из-за разнообразия использованных препаратов C<sub>60</sub> и примененных методов анализа. Так в 2004 г. неожиданно нашли токсическое воздействие водных наносuspензий фуллерена C<sub>60</sub> (nC<sub>60</sub>; 0,5 мг/мл) на дафний и на мальков большеротого окуня, проявляющегося в форме окислительного стресса (липидные перекиси) [34]. Однако позже выяснилось, что сама suspension готовилась с применением органического растворителя тетрагидрофурана (ТГФ), который

захватывался фуллереном, и токсичность препарата была связана именно с ним [34, 45, 46]. Например, LD<sub>50</sub> для суспензии C<sub>60</sub> (без ТГФ) в испытаниях на американском карпе (*Pimephales promelas*) достичь не удалось. Правда, в других тестах, на эмбрионах рыбки полосатый данио суспензия nC<sub>60</sub> (1,5 мг/л) через четверо суток вызывала нарушение сердечного ритма и отек перикарда, а также замедляла развитие молоди. Токсичность снижалась при добавлении антиоксиданта глутатиона, т. е. данный образец фуллерена повел себя как окислитель. Использование в том же тесте гидроксильной формы фуллерена (C<sub>60</sub>(OH)<sub>16-18</sub>) при 50 мг/л не вызывало никаких эффектов [47]. В других экспериментах, на дафниях, LD<sub>50</sub> не удалось достичь даже при максимально возможной концентрации для nC<sub>60</sub> — 35 мг/л в чистой воде и 22,5 мг/л в морской [34]. Многие дальнейшие исследования показали, что C<sub>60</sub> не обладает острой токсичностью, а токсические эффекты, которые иногда наблюдаются, связаны с токсическими органическими растворителями, используемыми для приготовления растворов C<sub>60</sub> [48].

Введение внутрибрюшинно мышам суспензии фуллерена в дозе 100 мг/кг не влияло на их поведенческие реакции (тест Irwin) по сравнению с контролем [49]. Также, при изучении острой пероральной токсичности на крысах для смеси фуллеренов C<sub>60</sub> и C<sub>70</sub> (фуллерит) в дозе 2000 мг/кг за весь период наблюдения не наблюдалось никаких отрицательных эффектов [50]. Воздействие фуллерена на кожу изучали на мышах, вводя образец внутрикожно в дозе 200 мкг. Через 72 часа не было выявлено никакого влияния ни на синтез ДНК, ни на индукцию орнитиндекарбоксилазы в эпидермисе. После подкожного введения образца фуллерена в дозе 100 мг/кг в течение 24 недель развитие опухолей (в отличие от группы мышей, которым вводили тетрадеканоилфорболацетат) не наблюдалось [51].

В общем, несмотря на большое количество биомедицинских исследований фуллерена, существует еще неопределенность относительно оценки его острой и, особенно, хронической токсичности, что в большой мере обусловлено разнообразием применяемых методик различными группами исследователей. Однако все больше данных свидетельствуют о безвредности немодифицированной формы фуллерена. Длительный эксперимент (5,5 лет) был проведен на крысах, в диету которых добавляли фуллерен в виде раствора в оливковом масле (C<sub>60</sub>-Olive), в качестве контроля использовали диеты с добавлением просто оливкового масла и воды. Оказалось, что фуллерен почти в два раза увеличивал продолжительность жизни крыс, а динамика изменения веса животных говорила об отсутствии явных токсических эффектов. Анализ механизмов действия с использованием экспериментальной модели интоксикации крыс четыреххлористым углеродом, показал, что влияние фуллерена на продолжительность жизни связано, по-

видимому, с подавлением окислительного стресса [52]. Самые последние эксперименты, проведенные на крысах, показали, что водная дисперсия  $C_{60}$ , стабилизированная крахмалом, не проявляет хронической токсичности при интрагастральном введении крысам, не обнаружено значимых различий в гематологических и биохимических показателях по сравнению с контролем [53].

Таким образом, данные, полученные разными исследователями на разных моделях *in vitro* и *in vivo*, свидетельствуют, что  $C_{60}$  при различных введениях в большинстве случаев не проявляет острой токсичности. Но все это справедливо лишь, если отсутствует фотооблучение, при котором фуллерен проявляет фотодинамическую активность и может генерировать активные формы кислорода. Рассматривая вопрос о токсичности, стоит учитывать возможности целостного организма по сравнению с клеточными культурами, крайне чувствительными к условиям инкубирования. В организме отработан механизм избавления от продуктов метаболизма и чужеродных агентов, в котором принимают активное участие селезенка, печень, лимфатическая и кровеносная система, желчные протоки. Если же воздействие носит длительный характер и/или адаптивные возможности организма снижены, то можно ожидать и развития побочных эффектов.

### ***Биологическая активность фуллерена и его соединений***

Фуллерен и его соединения начали испытываться уже в начале 90-х годов, почти сразу после его открытия. В основе биологической активности фуллерена лежат, в первую очередь, три свойства: липофильность, определяющая его адгезивность к белкам, липидам и мембранотропные свойства, электроноакцепторная активность, приводящая к способности взаимодействовать со свободными радикалами и АФК и способность к фотовозбуждению из возбужденного состояния передавать энергию молекуле обычного кислорода и превращать его в синглетный кислород. К сожалению, низкая растворимость в водной среде чистого кристаллического фуллерена ограничивает его непосредственное использование в качестве лекарственного средства. Поэтому, основные усилия в этом аспекте были связаны с модификацией фуллерена, направленные на придание ему водной растворимости.

Оказалось, что производные фуллерена можно эффективно использовать для блокады ВИЧ-инфекции [54]. Фотоактивированный фуллерен способен разрушать молекулу ДНК, вызывать апоптоз клеток, инактивировать бактерии. Фуллерены обладают также нейропротективным эффектом и могут быть полезны в терапии неврологических заболеваний, таких как болезни Альцгеймера и Лу Герига. Они проявляли себя и как блокаторы аллергического воспаления [55], как противоопухолевые

препараты [56], как радиозащитные агенты. Имеются работы, связанные с использованием фуллерена для доставки генного материала в клетки и ткани.

Отдельный вопрос связан с антигенной активностью фуллерена. Возможна ли генерация специфических антител в ответ на введение в организм фуллерена и его производных, обладает ли он иммуномодулирующей активностью? Как известно, антитела к простым углеродным материалам, графиту и алмазу, получить невозможно [57]. Установлено, что фуллерен в физиологической среде быстро взаимодействует с компонентами физиологической среды, белками, липидами и другими биомолекулами, содержащими гидрофобные фрагменты [58].

### ***Антивирусная и антибактериальная активность***

Первым производным, продемонстрировавшим способность ингибировать протеазу вируса ВИЧ-1 был N,N'-(2-гидроксикарбонилэтил-карбонил)-бис(2-аминоэтил)дифенилметанофуллерен-C<sub>60</sub> (MSAD-C<sub>60</sub>). Установлено, что процесс идет путем специфического блокирования субстрат-связывающего центра фермента, представляющего собой цилиндрическую полость. В опытах *in vitro* это производное проявляет активность против первичных вариантов ВИЧ-1 и ВИЧ-2, также как и против азотимидин-устойчивых мутантов. При ведении мышам в дозе 50 мг/кг в сутки в течение 6 дней не было выявлено видимых токсических эффектов. В последующих работах предпринимались неоднократные попытки оптимизировать структуру с учетом 3-мерного моделирования образуемого комплекса [59, 60]. Другой механизм противовирусного действия производных фуллерена может быть связан с блокированием нормальной сборки вирионов [61].

Карбоксифуллерен (трималонильное производное, С3) в концентрации 10 мкМ ингибирует вирус Денге-2 при освещении, т. е. за счет генерации активных форм кислорода (АФК) по фотохимическому механизму (см. ниже), но при 40 мкМ это соединение способно практически полностью подавлять репликацию вируса даже в полной темноте. Авторы предполагают, что инактивация вируса по светонезависимому механизму происходит на стадии абсорбции в результате гидрофобного взаимодействия С3 с липидной оболочкой вируса [5].

Другой пример использования производных фуллерена в медицине – комплекс немодифицированного фуллерена с ПВП – поливинилпирролидоном. Активная доза фуллеренов по отношению к вирусу гриппа типа А в 20 раз меньше, чем всем известного ремантадина. Фуллерен ингибирует репликацию вирусов гриппа А в дозах 250-1000 мкг/мл, не проявляя при этом цитотоксичности. С<sub>60</sub>/ПВП обладает активностью как против ДНК-, так и РНК-содержащих вирусов, в частности против вируса простого

герпеса. Их противовирусная активность зависит от дозы и от концентрации C<sub>60</sub> [27, 14].

Многие исследовательские группы изучали антибактериальное действие фуллерена, и положительные результаты были получены в отношении *Candida albicans*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* и *Mycobacterium avium* и др. Но механизмы его действия при этом, по-видимому, различны и зависят от структуры производного. Например, некоторые катионные азотсодержащие производные фуллерена подавляли рост *E.coli*, ингибируя потребление кислорода, в то время как анионное дималонильное производное C<sub>60</sub> было неактивно [62]. Биологические эффекты C3 изучали на 20 видах бактерий, препарат ингибировал все грамположительные виды в дозе 50 мг/л, в то время как рост грамотрицательных бактерий не подавлялся даже в 10 раз большей дозой. За повреждающее действие грамположительных бактерий был ответственен механизм, связанный с нарушением целостности клеточной мембраны [63, 64].

### ***Нейропротективная активность***

В конце 90-х годов на нескольких экспериментальных моделях *in vivo* и *in vitro* была продемонстрирована способность фуллерена предотвращать апоптоз нейронов. Мозг является чувствительным органом в отношении окислительного повреждения, вызванного свободными радикалами и АФК (O<sub>2</sub>• - супероксид, •ОН – гидроксил радикал и пероксид H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) [65]. Производные фуллеренов обладали способностью ингибировать цепную реакцию перекисного окисления липидов. В экспериментах на клеточных культурах карбоксифуллерен защищал корковые нейроны, а также показал надежную нейропротекцию в ряде других клеточных культур на моделях неврологических заболеваний, включая болезнь Паркинсона [8]. В экспериментах на мышах карбоксифуллерены (малонилфуллерены) показывали себя как эффективные нейропротекторы при некоторых формах склероза [9, 66]. При многих заболеваниях головного мозга (болезнь Альцгеймера, атеросклероз сосудов мозга, черепно-мозговые травмы) нарушается процесс регистрации и хранения информации в долговременной памяти. Для изучения этих вопросов используется модель подавления синтеза белка в головном мозге с помощью ингибиторов, в высоких дозах вызывающих апоптоз нейронов. В формировании долговременной памяти ключевую роль играет гиппокамп, двустороннее повреждение которого нарушает процесс запоминания у человека и животных. Для моделирования нарушения памяти у животных применяют ингибитор синтеза белка циклогексимид. Предварительное введение в дорзальный гиппокамп (микроинъекции) комплекса C<sub>60</sub>/ПВП (за 1 ч до ингибитора) полностью предотвращало нарушение пространственной памяти [67]. Препарат гидратированного фуллерена НуFn (водная дисперсия свободного фуллерена) существенно ускорял навигационное обучение при

решении вероятностной задачи. На ультраструктурном уровне в опытах *in vitro* впервые было показано, что НуFn оказывает сильное антиагрегационное действие на  $\beta$ -амилоидные ( $A\beta$ ) филаменты, характерные для болезни Альцгеймера. В опытах на модели острой нейротоксичности, вызванной у взрослых крыс микроинъекцией агрегированного  $A\beta_{25-35}$ , наблюдалось ослабление нарушения пространственной памяти. Авторы высказывают предположение, что фуллерены улучшают когнитивные процессы в норме и патологии и представляют большой интерес для разработки терапии болезни Альцгеймера [68].

В нескольких экспериментальных моделях *in vivo* и *in vitro* была продемонстрирована способность фуллерена предотвращать апоптоз нейронов. В экспериментах на мышах карбоксифуллерены показывали себя как эффективные нейропротекторы при некоторых формах склероза [69].

#### **Антиоксидантные свойства**

Результаты многих экспериментов показали, что фуллерены имеют огромный потенциал в качестве биологических антиоксидантов. Их антиоксидантные свойства обусловлены большой системой частично сопряженных двойных связей, способной принимать дополнительные электроны, например от свободных радикалов. Установлено, что одна молекула фуллерена может принимать до 34 метильных радикалов, эффективно захватывать и инактивировать как супероксиданион-радикалы, так и гидроксильные радикалы *in vivo* и *in vitro*. Ввиду этого фуллерен охарактеризовали как «губку, впитывающую свободные радикалы» [70]. Основным преимуществом использования фуллеренов в качестве медицинских антиоксидантов является их способность локализоваться внутри митохондрий и других компартментах, где происходит продукция свободных радикалов.

С3 фуллерены, полученные в виде двух изомерных водорастворимых соединений, демонстрировавших нейропротективную активность, оказались прекрасными ловушками для свободных радикалов, причем как *in vivo* так и *in vitro* [8]. Влияние же С3 на радикалы NO, как оказалось, не связано с его антиоксидантными способностями, в этом случае эффект обусловлен ингибированием работы фермента, продуцирующего  $NO^{\bullet}$  и ответственного за синтез цитруллина [71]. Еще одно водорастворимое производное  $C_{60}$  с 5 цистиновыми остатками на ядро, CFD, может улавливать как супероксид, так и гидроксильный радикал. Показано, что CFD не проявляет заметной токсичности и способен проникать через клеточную мембрану, блокируя накопление внутриклеточного пероксида [72].

Эксперименты, проведенные на крысах, показали, что водная дисперсия  $C_{60}$

приготовленная без использования органических растворителей, не только не обладает острой токсичностью у грызунов, но и защищает их печень от повреждения свободными радикалами [73]. Крысам вводили токсичный  $CCl_4$ , что вызывало образование трихлорметильного радикала  $CCl_3\cdot$  и серьезные повреждения печени. При реакции с кислородом формируются радикалы трихлорметилпероксида  $CCl_3OO\cdot$ , которые быстро инициируют цепную реакцию перекисного окисления липидов [74]. Молекула  $C_{60}$  способна инактивировать сразу большое количество таких радикалов, и это приводит к тому, что крысы, предварительно обработанные фуллереном, при интоксикации  $CCl_4$  не получают повреждения печени, что доказано гистологическими исследованиями.

Водорастворимые фуллеренол и карбоксифуллерен способны проникать через клеточную мембрану и локализоваться преимущественно в митохондриях [75, 76]. Поскольку именно эти клетки генерируют основную массу свободных радикалов и АФК в организме, то эти производные являются первыми претендентами на эффективный антиоксидантный препарат [77-79].

Сравнительный анализ антиоксидантной активности различных производных фуллерена (PEG/ $C_{60}$ , PVP/ $C_{60}$ , циклодекстрин- $C_{60}$ , фуллеренол и изостеариновая кислота/фуллерен) по отношению к кератиноцитам кожи человека показал, что все они имеют мощный блокирующий потенциал [80].

Фуллерены как акцепторы радикалов показали свою способность защищать рост клеток от различных токсинов, которые могут вызвать апоптотические повреждения *in vitro* [66, 69, 81] на различных типах клеток, таких как нейроны [8, 79], эпителиальные клетки [82].

При изучении защитной активности фуллерена против окислительного стресса при апоптозе периферических мононуклеарных клеток человека (МКПК), вызванным 2-дезоксид-Д-рибозой или TNF- $\alpha$  с циклогексимидом, установлено, что карбоксифуллерен защищает МКПК от апоптоза путем сохранения целостности митохондриальной мембраны [83].

Фуллерены применяли также для защиты клеток против действия ультрафиолета [84]. Ультрафиолетовое облучение (320-400 нм) генерирует АФК, что оказывает биологическое воздействие на клетки кожи человека, приводя к повреждению и гибели клеток. Комплекс водорастворимого  $C_{60}$ /поливинилпирролидон был испытан в качестве защиты против окислительного стресса. В этом случае способность фуллерена проникать в глубокие слои эпидермиса кожи человека и устойчивость к окислительной деградации, делает его более перспективным препаратом, чем витамин С, он предотвращает старение кожи без фотосенсибилизации и цитотоксичности.

Производные фуллерена могут рассматриваться и как перспективные лекарственные средства для профилактики и коррекции ишемических повреждений, например, при реперфузии ишемизированного трансплантата. Поврежденные ишемией митохондрии могут продуцировать большее количество электронов за счет их «утечки» из электронно-транспортной цепи. Эти электроны и участвуют в образовании супероксиданион-радикала. Гексасульфобутилфуллерен (ГСБФ), содержащий 6 сульфобутильных групп, введенный в перфузат изолированного сердца, значительно снижал содержание свободных радикалов по данным ЭПР [85]. ГСБФ был также активен и в случае инфаркта головного мозга [86], что роднит его с препаратом СЗ. Введение фуллеренола также приводило к снижению тканевого содержания индикаторов окислительного стресса — конъюгированных диенов и малонового диальдегида, определенного через 30 и 60 мин после реперфузии. Кроме того, фуллеренол предохранял трансплантат от вызванного ишемией-реперфузией истощения тканевых запасов глутатиона [87]. Другой препарат фуллерена  $C_{60}(ONO_2)_{7\pm 2}$  снижал выраженность ишемически-реперфузионного повреждения изолированных легких крысы [88].

### ***Противоопухолевая активность***

Благодаря фотодинамической (ФД) активности фуллерены являются потенциальными противоопухолевыми агентами. ФД терапия представляет собой метод локальной активации светом накопившегося в опухоли фотосенсибилизатора (ФС), что в присутствии тканевого кислорода приводит к развитию фотохимических реакций, разрушающих опухолевые клетки. При этом фуллерен, выступая как генератор, конвертирует кислород из триплетного состояния в синглетное [89, 90].

При недостатке кислорода фуллерен способен продуцировать свободные радикалы, что также приводит к гибели клеток [91]. Соединения  $C_{60}$  в результате ассоциации гидрофобных ядер агрегируют в водной среде, что способствует более интенсивному накоплению их клетками опухоли по сравнению с нормальными тканями из-за повышенной проницаемости кровеносных сосудов, питающих опухоль, и относительной незрелости лимфатической системы. При действии  $nC_{60}$  на рост опухолевых клеток меланомы мышей В16 *in vitro* наблюдается окислительный стресс, митохондриальная деполяризация и, как результат, активация каспазного каскада [92]. При изучении противоопухолевого действия  $nC_{60}$  с концентрацией 1 мкг/мл на клетки глиомы человека (линия U251), и клетки глиомы крыс (линия С6), авторы установили, что происходит генерация окислительного стресса, с последующим некрозом, повреждением мембраны и смертью клеток [93]. С клетками саркомы мышей была похожая картина, при концентрации  $nC_{60}$  0,25 мкг/мл наблюдалась аутофагия и остановка пролиферации в



G2/M-фазе, причем фуллерен концентрационно-зависимым образом влиял и на дифференцировку мышинных эмбриональных стволовых клеток [94].

### ***Проницаемость клеточных мембран для фуллерена***

Многие данные, связанные с эффектами фуллерена на клетки, бактерии и целые организмы, в том числе и прохождение ГЭБ, указывали на то, что гидрофобный фуллерен способен проникать через биологические мембраны. Однако специальных исследований на эту тему пока сравнительно мало и детали трансмембранной транслокации фуллерена еще плохо изучены. Еще в 1994 г. появились данные о том, что  $^{14}\text{C}$ -меченый фуллерен быстро поглощается кератиноцитами [95]. В одной из дальнейших работ было установлено, что бислойные фосфатидил-липосомы, применяемые как модель биологических мембран, хорошо проницаемы для аминокислотных производных  $\text{C}_{60}\text{-Ala}$  и  $\text{C}_{60}\text{-Ala-Ala}$ , причем они способны проходить внутрь липосом [13]. Позже аналогичные производные,  $\text{C}_{60}\text{-Pro}$ ,  $\text{C}_{60}\text{-Arg}$  и  $\text{C}_{60}\text{-}\epsilon\text{-аминокапроновая кислота (C}_{60}\text{-Asp)}$ , были изучены уже на биологическом объекте, на препаратах симбиосом — азотфиксирующих органелл из корневых клубеньков люпина желтого. Кинетику диссипации мембранного потенциала ( $\Delta\psi$ ) или  $\Delta\text{pH}$  под действием соединений фуллерена измеряли с помощью потенциал-чувствительных зондов и pH-индикаторов. Полученные данные позволили заключить, что диссипация потенциала этими соединениями всецело обусловлена их способностью проникать внутрь симбиосом в форме липофильных ионов [12].

В 2002 г. также появилась первая работа по прямой локализации  $\text{C}_{60}$ -соединения, дикарбоксифуллерена  $\text{C}_{60}\text{C}(\text{COOH})_2$ , внутри клеток, при этом была использована флуоресцентная микроскопия и радиоактивная углеродная метка. Указанный дикарбоксифуллерен представляет интерес как нейропротективный агент при лечении болезни Паркинсона и других нейродегенеративных заболеваний [8]. Эксперименты проводились с линиями HS68 человеческих фибробластов и почки обезьяны COS-7. Соединение через 24 часа локализовалось, в основном, в митохондриях и плазматической мембране, в цитозольной фракции его было на порядок меньше [75]. Таким образом, эти данные подтверждали, что производные фуллерена могут преодолевать клеточную мембрану и достигать митохондрий. Позже, в 2006 г., группа исследователей из Китая представила данные по транспорту того же соединения, конденсированного с флуоресцентной меткой, FITC-кадаверином. После инкубации в течение 30 мин с клетками HeLa конъюгат транспортировался через мембрану и локализовался в цитоплазме, что фиксировалось флуоресцентной микроскопией. При этом сам FITC-

кадаверин не способен проходить внутрь клетки, т. е. фуллерен выступал в роли паровоза, промотируя его транспорт [96]. В последующей работе та же группа [97] с помощью электронной микроскопии привела доказательства, что транслокация частиц дикарбоксифуллерена (размер 100-400 нм) в клетки (фибробласты) идет, по-видимому, через клатрин-опосредованный эндоцитоз по энергозависимому механизму. Интересно, что в этих экспериментах авторы показали, что частицы через 2 часа после инкубации с клетками локализуются, в основном, в лизосомах, но не в митохондриях или ядрах. В другой работе показано, что фуллерены могут транслоцироваться как в цитоплазму, так и в ядро клетки [98]. Наши ранние исследования демонстрировали, что аминокислотные, мономалоновые и трималоновые производные фуллерена C<sub>60</sub>, и даже его немодифицированная коллоидная форма (nC<sub>60</sub>) способна проходить через клеточные мембраны эритроцитов, тромбоцитов и симбиосом. Причем скорость транспорта таких соединений сравнима со скоростью переноса ионов K<sup>+</sup> и H<sup>+</sup> ионофорами валиномицином и FCCP (карбонилцианид-*n*-трифторметокси-фенилгидразоном). Однако, скорость транспорта немодифицированного фуллерена (nC<sub>60</sub>) была существенно медленнее [99].

### ***Иммунологические эффекты***

Один из важных аспектов связан с иммунологической реактивностью организма на фуллерен, возможные гипотетические эффекты включают гиперактивацию клеток иммунной системы с выбросом медиаторов, провоцирующих воспалительные реакции, продукцию специфических антител с последующей сенсibilизацией, формирование комплексов с аутоантигенами, ведущее к аутоиммунной реактивности.

Фуллерен кардинально отличается по структуре от всех известных биогенных молекул, и можно предположить, что вряд ли в иммунном репертуаре присутствуют клоны с рецепторами, обладающие достаточным аффинитетом к этой молекуле. В реальности вряд ли может происходить экспонирование очень гидрофобной молекулы фуллерена клеточным рецепторам. В физиологической гидрофильной среде неизбежно будет идти его взаимодействие с ее компонентами: белками, липидами и другими молекулами, имеющими гидрофобные участки [58, 100], таким образом, углеродная поверхность практически будет недоступна для распознавания.

Как известно, антитела к простым углеродным материалам, графиту и алмазу, гораздо более распространенным веществам, получить практически невозможно [57, 101], именно вследствие этого они активно используются в эндопротезировании. С другой стороны, антифуллереновые антитела представляют ценный инструмент для анализа фуллерена в биологических средах. Такой анализ имеет прямое отношение и к системе токсикологического контроля нанопродукции. Однако, в случае фуллерена и его

производных – это очень сложная задача. Наибольшее распространение пока получил метод ВЭЖХ в сочетании с УФ- или масс-спектрометрическими детекторами. Он предусматривает предварительную экстракцию фуллерена органическим растворителем, но это довольно трудоемкий и дорогой метод, а точность и чувствительность его оставляет желать лучшего.

Естественно, что более специфичный и универсальный метод анализа в биологической среде – иммуноферментный, его чувствительность может достигать пико и сотен фемптограмм на мл образца, особенно при использовании люминесцирующих субстратов. Центральная проблема в этой схеме – необходимо иметь специфическое антитело к молекуле фуллерена. В конце 90-х годов были опубликованы данные о продукции специфических анти- $C_{60}$ -антител класса IgG, полученных при иммунизации мышей BALB/c конъюгатом высокомолекулярного белка тироглобулина с фуллереновым производным, содержащим сукцинильную функцию [102]. Авторы построили компьютерную модель взаимодействия фуллерена с антителом, они предполагали, что чистые фуллерены  $C_{60}$  и  $C_{70}$  могут распознаваться антителами с гидрофобными аминокислотами в связывающем центре [103]. Однако эта работа не получила дальнейшего развития и реального практического применения в формате иммуноферментного анализа (ИФА), к тому же ей имелся целый ряд неясных моментов. Однако, относительно недавно российские исследователи [53] сумели получить  $C_{60}$ -специфические поликлональные и моноклональные антитела IgG-класса, способные распознавать фуллерен. На основе конкурентного поляризационного флуоресцентного иммуноанализа им удавалось определять с высокой чувствительностью различные углеродные наноматериалы в биологической ткани. Правда, осталось неясным, какую форму фуллерена детектируют эти антитела – одиночную молекулу фуллерена или кластер, фуллерен со свободной поверхностью или фуллерен, покрытый водной оболочкой, или некий комплекс фуллерена с белком.

В работах по изучению антигенности фуллерена две группы исследователей из России демонстрировали, что фуллерен не проявляет заметной антигенной активности. В этих работах применялись аминокислотные производные фуллерена и их конъюгаты с белками в присутствии сильных адъювантов. Но продукции специфических антител (IgG класса) не наблюдалось ни в одном опыте [37, 104]. В этих же работах также отмечали наличие адъювантного эффекта у фуллерена [104], и некоторые результаты дали основание предполагать, что присоединение фуллерена к белку может усиливать его аллергическую активность [37].

Установлено, что некоторые производные фуллерена могут подавлять IgE-зависимый аллергический ответ. Так полигидроксифуллерен ( $C_{60}(OH)_n$ ,  $n=18-22$ ) и N-этилполиаминофуллерен ( $C_{60}(NHCH_2CH_3)_n$ ,  $n=6-18$ ) ингибировали *in vitro* IgE-зависимую дегрануляцию тучных клеток и секрецию ими цитокинов и простагландинов в ответ на стимуляцию аллергеном. Авторы предположили, что этот эффект связан со снижением уровня АФК в клетках, т. е. блокированием окислительного стресса при аллергической реакции за счет антиоксидантной активности фуллерена [105]. Противовоспалительная активность производных фуллерена была зарегистрирована рядом исследователей [106]. При их инкубировании с тучными клетками и базофилами крови человека они подавляли гиперчувствительность I типа, а в модели анафилаксии, они тормозили высвобождение гистамина. Предполагалось, что этот эффект связан со снижением уровня АФК в клетках [105]. Отмечалось также, что фуллерен способен сингибировать продукцию провоспалительных цитокинов, секреция которых опосредована фактором некроза опухоли (TNF- $\alpha$ ) в синовиальных фибробластах, лимфоцитах и макрофагах. Таким образом, фуллерен, очевидно, является перспективным препаратом для лечения артрита [107]. С другой стороны, показано, что водная дисперсия фуллерена, полученная методом Андриевского (перенос  $C_{60}$  из толуольного раствора в водный, используя ультразвук) [23], вызывала экспрессию генов провоспалительных цитокинов (IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6) и Th1 цитокинов (IL-12, IFN- $\gamma$ ) у мышей при аэрозольном введении в дыхательные пути [108]. Производные фуллерена, фуллерол и N-этил-полиамино-фуллерен (перо- $C_{60}$ ) не влияли на реактивность Т-клеток, продукцию цитокинов, соотношение CD4/CD8, но значительно усиливали секрецию IL-6 и экспрессию CD69 у натуральных киллеров. Авторы сделали вывод, что они действуют только на клетки врожденной иммунной системы [100]. Те же соединения ингибировали IgE-зависимую дегрануляцию тучных клеток и секрецию ими цитокинов и простагландинов в ответ на провокацию аллергеном. Водная дисперсия чистого фуллерена,  $C_{60}FWS$ , проявляла ингибирующий эффект на IgE-опосредованную секрецию гистамина из базофилов периферической крови в системе *in vitro* и подавляла анафилаксию у мышей вызванную введением овальбумина [110]. Недавно показано, что аналогичный препарат проявлял заметную модулирующую активность в реакции ГЗТ, подавлял развитие воспаления и выброс цитокинов Th1-профиля [111]. Складывается впечатление, что фуллерен способен ингибировать как Th1, так и Th2-иммунный ответ, и может представлять интерес как перспективный препарат для лечения воспалительных заболеваний.

#### **Фотодинамическая активность**

Фотодинамическая терапия (ФДТ) представляет собой метод локальной активации светом доставленного в опухоль фотосенсибилизатора (ФС), что в присутствии тканевого кислорода приводит к развитию фотохимических реакций, разрушающих опухолевые клетки. Известно, что при введении в организм фотосенсибилизаторов они селективно накапливаются в клетках опухоли, и последующее облучение их светом низкоэнергетического лазера с соответствующей длиной волны приводит к генерации свободных радикалов и синглетного кислорода, разрушающих опухоль. ФС можно вводить внутривенно, перорально или непосредственно апплицировать на опухолевую ткань. После накопления ФС опухоль облучают светом в видимом диапазоне, что в присутствии кислорода вызывает ее деструкцию. Физико-химические свойства ФС должны обеспечивать достаточно высокую селективность их накопления в опухоли, низкую токсичность для нормальных клеток и высокую фототоксичность для злокачественных клеток, связанную с высоким квантовым выходом синглетного кислорода. Применяемые в настоящее время ФС являются производными фталоцианинов, природных тетрапирролов (гематопорфирин, бактериохлорин), и имеют характерные полосы поглощения в области 400-650 нм. Одно из ограничений современной ФДТ — небольшая глубина проникновения света сквозь биологическую ткань из-за использования относительно коротковолновой части спектра (600-650 нм). Фуллерены и его производные проявляют сильное поглощение в УФ-диапазоне и более слабое, но еще значимое, в видимой области и ближнем ИК-диапазоне. При облучении светом они легко переходят в возбужденное состояние и становятся фотоиндуцированными переносчиками электронов и могут использоваться как эффективные ФС [112-114]. В физиологических условиях такие изменения приводят к генерации АФК, при этом фуллерен, выступая как генератор, конвертирует кислород из триплетного состояния в синглетное [89, 90]. Цитотоксический эффект прежде всего опосредован повреждением молекул ДНК (окисление гуанозина), и даже при недостатке кислорода может происходить гибель клеток [91]. Ассоциаты фуллерена накапливаются преимущественно в клетках опухоли из-за повышенной проницаемости кровеносных сосудов, питающих опухоль. Например, фотооблучение локального участка кожи мышей, которым была привита фиброма и затем обработана фуллереном, модифицированным полиэтиленгликолем, приводило к некрозу опухоли без повреждения здоровой ткани [115, 116]. Раковые клетки селективно накапливают  $C_{60}/ПЭГ$  после его внутривенного введения, по сравнению с нормальной кожей и мышцами коэффициент селективности для опухоли через 24 ч составлял 2,5 и 17 соответственно. Активный некроз наблюдался в дозе 0,4 мг/кг веса, здоровая ткань, окружающая опухоль, никак не затрагивалась [117]. Аминокислотные аддукты фуллерена

оказались хорошими ФС для ФДТ, при этом дополнительный вклад в активность (гибель опухолевых клеток) вносили иммунологические эффекты с невыясненным пока механизмом действия [118].

Для дополнительной информации ниже приведена сводная таблица по некоторым биологическим эффектам фуллерена и ссылками на источник (таблица 1.2).

Таблица 1.2 – Биологические эффекты фуллерена  $C_{60}$  и его производных

<i>Структура</i>	<i>Эффект</i>	<i>Источник</i>
Фуллерен $C_{60}$	Дезорганизация структуры $\beta$ -амилоида (болезнь Альцгеймера)	119
1,2-(Диметоксиметано)-фуллерен	Ингибирование фибрилл $\beta$ -амилоида	120, 121
Комплекс $C_{60}$ /Поли-(2-этил-2-оксазолин)	Нейрональная антиоксидантная активность	122
Гидрат фуллерен(трис-аминокапроновой кислоты)	Противовирусное действие в отношении респираторно-синцитиального вируса	123
Комплекс $C_{60}$ /ПВП	Фотодинамическая инактивация вирусов	124
Комплекс $C_{60}$ /ПВП	Ингибирование развития артрита	125
Тетракарбокситил-фуллерен, фуллеренол	Ингибирование каталитической активности моноаминоксидазы В при болезни Альцгеймера	126
Иммуносупрессивные и противовоспалительные свойства	Анализ иммунных эффектов	127, 128
Фуллеренол $C_{60}(OH)_{20}$	Анти-опухолевое действие	129
Функционализированные фуллерены	Потенциальное применение для терапии рака	130
Фуллеренол	Моделирование взаимодействия с белками	131
Фуллерен и фуллеренол	Механизмы взаимодействия с биологической мембраной митохондрий	132
Аминоалкилфуллерены	Проведен анализ молекулярного механизма цитотоксичности	133
Фуллеренол $C_{60}(OH)_{24}$	Блокирование апоптоза, вызванного окислительным стрессом	134

Водная дисперсия фуллерена	Снижение токсичности лекарств с ароматическими ядрами	135
Водная дисперсия фуллерена	Изучение взаимодействия с АТФ скелетных мышц и эффектов на их функцию	136
Фуллерен C <sub>70</sub> , модифицированный миоинозитом	Изучение сигнальных процессов подавления высвобождения медиаторов воспаления	137
Косметический гель с комплексом C <sub>60</sub> /ПВП	Лечение акне, изучение механизма действия	138
Фуллереновые липосомы	Изучение антиоксидантной активности и применение в качестве контрастирующих агентов для МРТ	139
Маннозилированный фуллерен («сахарный шар»)	Как ингибитор гликозидаз, активность против псевдовируса Эбола	140
Фуллеренол, N-этил-полиамино-фуллерен	Изучение эффектов на секрецию цитокинов в системе in vitro	141
Фуллерен C <sub>70</sub> -тетрагликолят	Ингибирование дегрануляции тучных клеток и секреции провоспалительных цитокинов	142
Конъюгат фуллерена с тафтсином	Усиление фагоцитирующей и хемотактической активности макрофагов и экспрессии молекул МНС II	143
Конъюгат фуллерена с порфирином, содержащим ион парамагнитного изотопа магния, 25Mg <sup>2+</sup>	Усиливает синтез АТФ в условиях гипоксии в сердечной мышце.	144
Водная дисперсия фуллерена	Модуляция активности Ca(2+)/кальмодулин-зависимой протеинкиназы II	145
Конъюгат фуллерена с доксорубицином	Пролонгированная противопухоловая активность	146
Конъюгат фуллерена с гиалуроновой кислотой	Антиопухолевый эффект	147
Водная дисперсия фуллерена	Анализ фармакокинетики фуллерена, распределение между венозной и	148

	артериальной тканями	
Фуллерен C <sub>60</sub>	Теоретическое исследование: из изученных молекул фуллерена лишь C <sub>60</sub> специфически разрушает фибриллы амилоидного пептида Aβ17-42, ответственных за возникновение болезни Альцгеймера	149

## Заключение

Анализ научной литературы последнего десятилетия показал существенное расширение сферы практического применения фуллеренов. Однако ясно вырисовывается недостаточность и некоторая противоречивость результатов исследований по токсикологии, иммунологии и ряду других разделов. Результаты, полученные *in vitro*, нередко несопоставимы с результатами *in vivo*. Пока нет ни одного полноценного длительного тщательного доклинического и клинического исследования препарата на основе фуллерена. Очень важным представляется разработка методов, позволяющих проводить надежную оценку данных эксперимента. Некоторая трудность здесь связана с тем, что фуллерен и его соединения имеют склонность формировать ассоциаты, в том числе и с компонентами среды, часто с непредсказуемыми свойствами (нерастворимость, необратимая адсорбция), растворы немодифицированного фуллерена чувствительны к ионной силе, поэтому известные методики в приложении к ним требуют предварительной оценки и отработки. Несмотря на эти трудности, многие исследователи продолжают работы с фуллеренами в надежде на создание эффективных фармпрепаратов и других средств.



## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kroto H.W., Heath J.R., O'Brien S.C., Curl R.F., Smalley R.E. C<sub>60</sub>: Buckminsterfullerene. Nature; 1985, 318, 162-163.
2. Kratschmer W., Lamb L.D., Fostiropoulos K., Huffman D.R. Solid C<sub>60</sub>: a new form of carbon. Nature; 1990, 347:354-356.
3. Yang X. L. Photo-induced cytotoxicity of malonic acid [C<sub>60</sub> fullerene derivatives and its mechanism / X . L . Yang , C. H . Fan , H . S. Zhu // Toxicology in vitro. - 2002. - Vol. 16. - P. 41-46.
4. Меджидова М. Г. Противовирусная активность аминокислотных производных фуллерена при цитомегаловирусной инфекции in vitro / М. Г. Меджидова, М. В. Абдуллаева, Н. Е. Федорова, В. С. Романова, А. А. Куш // Антибиотики и химиотерапия. - 2004 . - Т. 49 . - № 8-9 . - С. 13-20 .
5. Lin Y. L. Light-independent inactivation of dengue-2 virus by carboxyfullerene C<sub>60</sub> isomer / H. Y. Lei, T. . Luh, C. K. Chou, H. S. Liu // Virology. - 2000. -Vol. 275. - P. 258-262. .
6. Tsao N., Luh T., Chou C., Wu J., Lin Y., and Lei H., "Inhibition of group A streptococcus infection by carboxyfullerene," Antimicrobial Agents and Chemotherapy, vol. 45, no. 6, pp. 1788–1793, 2001.
7. Wang I. C. C<sub>60</sub> and water-soluble fullerene derivatives as antioxidants against radical-initiated lipid peroxidation / I. C. Wang [et al] // J. Med. Chem. -1999. - Vol. 42. - P. 4614-4620.
8. Dugan L. L. Carboxyfullerenes as neuroprotective agents / L. L. Dugan | et al. | // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1997. - Vol. 94. - P. 9434-9439.
9. Dugan L. L. Fullerene-based antioxidants and neurodegenerative disorders / L. L. Dugan [et al.] // Parkinsonism Relat. Disord. - 2001. - Vol. 7. - P. 243-246.
10. Kasermann F. Buckminsterfullerene and photodynamic inactivation of viruses / F. Kasermann , C. Kempf // Rev. Med. Virol. - 1998. - Vol. 8. - P. 143-151.
11. Vileno B. In vitro assay of singlet oxygen generation in the presence of water-soluble derivatives of C<sub>60</sub> / B. Vileno // Carbon. - 2004. - Vol. 42. -P. 1195-1198.
12. Андреев И. М. Аминокислотные производные фуллерена C<sub>60</sub> ведут себя как липофильные ионы, проникающие через биологические мембраны / И. М. Андреев, В. С. Романова, А. О. Петрухина, С. М. Андреев // Физика твердого тела. - 2002. - Т. 44. - С. 658-660.

13. Kotelnikova R. A., Kotelnikov A. I., Bogdanov G. N., Romanova V. S., Kuleshova E. F., Parnes Z. N., Volpin M. E. Memranotropic properties of the water-soluble amino acid and peptide derivatives of fullerene C<sub>60</sub>. *FEBS Letters*, 1996; 389: 11-114.
14. Пиотровский Л. Б. Фуллерены в биологии / Л. Б. Пиотровский, О. И. Киселев. — СПб.: ООО «Издательство „Росток"», 2006. — 336 с.
15. Елецкий А.В., Смирнов Б.М. Фуллерены и структура углерода. // УФН.-1995.-№ 9 - с. 976-1009
16. Pandey R.K., Smith K.M., Dougherty T.J. Porphyrin Dimers as Photosensitizers in Photodynamic Therapy // *Journal of Medicinal Chemistry*. 1990. – № 33. – P. 2032.
17. Юровская М. А. Методы получения производных фуллерена C<sub>60</sub> // Соросовский образовательный журнал, том 6, №5, 2000
18. Ruoff R. S., Tse D. S., Malhotra R., Lorents D. C. Solubility of fullerene (C<sub>60</sub>) in a variety of solvents. *J. Phys. Chem.*, 1993; 97: 3379-3383
19. Semenov K.N., Charykov N.A., Keskinov V.A. et al. Solubility of light fullerenes in organic solvents // *J. Chem. Eng. Data*. – 2010. – V. 55, N 1 – P. 13–36.
20. Mchedlov-Petrosyan N. O. Fullerenes in Liquid Media: An Unsettling Intrusion into the Solution Chemistry. *Chem. Rev.*, 2013, 113(7), 5149–5193
21. Безмельницын В. Н., Елецкий А. В., Окунь М. В. Фуллерены в растворах. *Успехи физ. наук*, 1998; 168: 1195-1120
22. Мчедлов-Петросян Н. О. Растворы фуллерена C<sub>60</sub>: коллоидный аспект. *Хімія, фізика та технологія поверхні*, 2010, Т. 1, №1, 19-37.
23. Andrievsky G. V., Kosevich M. V., Vovk O. M., Shelkovsky V. S., Vashchenko L. A. On the production of an aqueous colloidal solution of fullerenes. *J. Chem. Soc.*, 1995; 12: 1281-1282.
24. Deguchi S., Mukai S.-a., Yamazaki T. et al. Nanoparticles of fullerene C<sub>60</sub> from engineering of antiquity // *J. Phys. Chem. C*. – 2010. – V. 114, N 2. – P. 849–856.
25. Chen K.L., Smith B.A., Ball W.P., Fairbrother D.H. Assessing the colloidal properties of engineering nanoparticles in water: case studies from fullerene C<sub>60</sub> nanoparticles and carbon nanotubes // *Environ. Chem*. – 2010. – V. 7. – P. 10–27
26. Dhawan A., Taurozzi J.S., Pandey A.K., Shan W.Q., Miller S.M., Hashsham S.A., Tarabara V.V. Stable colloidal dispersion of C<sub>60</sub> fullerene in water: evidence for genotoxicity. *Environ. Sci. Technol.*, 2006, 40, 7394-7401.
27. Пиотровский Л.Б. Влияние комплексов фуллерена C<sub>60</sub> с поливинилпирролидоном на репродукцию вирусов гриппа / Пиотровский Л.Б. и др. // *Вопросы вирусологии*. 2001. №3. С. 38-42.

28. Guskova O. A., Varanasi S. R. and Sommer J.-U. C<sub>60</sub>-dyad aggregates: Self-organized structures in aqueous solutions // *J. Chem. Phys.*, 2014, 141, 144303
29. Andersson T., Nilsson K., Sundahl M., Westman G., Wennerström O. C<sub>60</sub> embedded in  $\gamma$ -cyclodextrin: a water-soluble fullerene. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1992. P. 604-605.
30. Torresa V.M., Posac M., Srdjenovic B., Simplicio A.L.//Solubilization of fullerene C<sub>60</sub> in micellar solutions of different solubilizers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 2011. № 82. P. 46-53.
31. Avdeev M.V., Aksenov V.L., Tropin T.V.//Models of cluster formation in solutions of fullerenes. *Russ. J. Phys. Chem. A* 2010. № 84. P. 1273-1283.
32. Konarev D.V., Litvinov A.L., Kovaltovsky A.Yu., Drichko N.V., Coppens R.N., Lubovskaya R.N.//Molecular complexes of fullerene C<sub>60</sub> with aromatic hydrocarbons: Crystal structures of (TPE)<sub>2</sub>C<sub>60</sub> and DPA·C<sub>60</sub>. *Synthetic Metals.* 2003. № 133-134. P. 675-677.
33. Shukla M.K., Leszczynski J.//Fullerene (C<sub>60</sub>) forms stable complex with nucleic acid base guanine. *Chem. Phys. Letters.* 2009. № 469. P. 207–209.
34. Oberdörster E., Zhu S., Blickley T.M., McClellan-Green P., Haasch M.L.//Ecotoxicology of carbon-based engineered nanoparticles: Effects of fullerene (C<sub>60</sub>) on aquatic organisms. *Carbon.* 2006. № 44. P. 1112-1120.
35. Gao J., Wang H.L., Shreve A., Iyer R. Fullerene derivatives induce premature senescence: A new toxicity paradigm or novel biomedical applications. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2010; 244:130–43.
36. Ueng, T.H., Kang, J.J., Wang, H.W., Cheng, Y.W., and Chiang, L.Y. 1997. Suppression of microsomal cytochrome P450-dependent monooxygenases and mitochondrial oxidative phosphorylation by fullerenol, a polyhydroxylated fullerene C<sub>60</sub>. *Toxicol. Lett.* 93: 29-37.
37. Андреев С. М., Бабахин А. А., Петрухина А. О., Романова В. С., Парнес З. Н., Петров Р. В. Иммуногенные и аллергенные свойства конъюгатов фуллерена с аминокислотами и белком. *Докл. РАН*, 2000, 390(2):261-264.
38. Rajagopalan P., Wudl F., Schinazi R.F., Boudinot F.D. Pharmacokinetics of a Water-Soluble Fullerene in Rats // *Antimicrob Agents Chemother* 1996 - V. 40 - P. 2262-2265.
39. Chen H. H., Yu C., Ueng T. H., Chen S., Chen B. J., Huang, K. J., Chiang L.Y. Acute and subacute toxicity study of watersoluble polyalkylsulfonated C<sub>60</sub> in rats. *Toxicol. Pathol.*, 1998A; 26: 143-151.

40. Yamago S., Tokuyama H., Nakamura E., Kikuchi K., Kananishi S., Sueki K., Nakahara H., Enomoto S., Ambe F. In vivo biological behavior of a water-miscible fullerene:  $^{14}\text{C}$  labeling, absorption, distribution, excretion and acute toxicity. *J. Chem. Biol.*, 1995; 2: 385-389.
41. Da Ros T., Spalluto G., Prato M. Biological Applications of Fullerene Derivatives: A Brief Overview. *Croatica Chemica Acta*, 2001, 74 (4), 743-755.
42. Moussa F., Chretien P., Dubois P., Chuniaud L., Dessante M., Trivin F., Sizaret P.Y., Agafonov V., Ceolin R., Szwarc H., Greugny V., Fabre C., Rassat A. // *Full. Sci. Technol.* 1995. V. 3. P. 333.
43. Moussa F., Trivin F., Ceolin R., Hadchouel M., Sizaret P.Y., Greugny V., Fabre C., Rassat A., Szwarc H. // *Full. Sci. Technol.* 1996. V. 4. P. 21.
44. Scrivens W. A., Rawlett A. M., Tour J. M. Preparative benchtop enrichment of C(60), C(70), and the higher fullerene allotropes using a brominated polystyrene stationary phase. *J. Org. Chem.*, 1997; 62: 2310-2311.
45. Oberdörster E., Stone S., Donaldson K. Toxicology of nanoparticles: A historical perspective. *Nanotoxicology*, 2007; 1(1): 2-25.
46. Joner E.J., Hartnik T., Amundsen C. E. Environmental fate and ecotoxicity of engineered nanoparticles. Norwegian Pollution Control Authority, 2008. Report no. TA 2304/2007.
47. Andrievsky G.V., Klochkov V.K., Derevyanchenko L. Is C<sub>60</sub> fullerene molecule toxic?! *Fullerenes, Nanotubes, Carbon Nanostruct.*, 2005; 13(4):363-376.
48. Gharbi N., Pressac M., Hadchouel M., Szwarc H., Wilson, S.R. and Moussa F. [60] Fullerene is a powerful antioxidant in vivo with no acute or subacute toxicity. *Nano Lett.*, 2005, 5(12):2578-2585.
49. Satoh M., Takayanagi I. Pharmacological studies on fullerene (C<sub>60</sub>), a novel carbon allotrope, and its derivatives. *J. Pharmacol. Sci.*, 2006; 100(5): 513-518.
50. Mori T., Takada H., Ito S., Matsubayashi K., Miwa N., Sawaguchi T. Preclinical studies on safety of fullerene upon acute oral administration and evaluation for no mutagenesis. *Toxicology*, 2006; 225: 48-54.
51. Nelson M. A., Domann F. E., Bowden G. T., Hooser S. B., Fernando Q., Carter D. E. Effects of acute and subchronic exposure of topically applied fullerene extracts on the mouse skin. *Toxicol Ind Health*, 1993; 9(4): 623-630.
52. Baati T., Bourasset F., Gharbi N., Njim L., Abderrabba M., Kerkeni A., Szwarc H., Moussa F. The prolongation of the lifespan of rats by repeated oral administration of [60] fullerene. *Biomaterials*, 2012, 33, 4936-4946

53. Hendrickson O., Fedyunina N., Zherdev A., Solopova O., Sveshnikov P., Dzantiev B. Production of monoclonal antibodies against fullerene C<sub>60</sub> and development of a fullerene enzyme immunoassay. *Analyst*, 2012, 137(1):98-105.
54. Sijbesma, R.; Srdanov, G.; Wudl, F.; Castoro, J.A.; Wilkins, C.; Friedman, S.H.; DeCamp, D.L.; Kenyon, G.L. Synthesis of a fullerene derivative for the inhibition of HIV enzymes. *J. Am. Chem. Soc.* 1993, 115, 6510-6512.
55. Bredas JL; and Durrant JR; *Accounts Chem. Res.*, 42; 1689-1692; 2009.
56. Нуретдинов И.А., Губская В.П., Corvaia C., Губайдуллин А.Т., Коновалова Н.П. Квантовые и биологические свойства нитроксидных метанофуллеренов // *Наночастицы в конденсированных средах: сборник научных статей.* 2008, с. 225-230.
57. Pinneo M. Diamond Growth: Today and Tomorrow, in Krummenacker M. & Lewis J. (eds). *Prospects in Nanotechnology: Toward Molecular Manufacturing, Proceedings of the First General Conference on Nanotechnology: Development, Applications, and Opportunities*, 11-14 November 1992, John Wiley & Sons, New York, 1995. pp. 147-172.
58. Belgorodsky B., Fadeev L., Ittah V., Benyamini H., Zelner S., Huppert D., Kotlyar A. B., Gozin M. Formation and characterization of stable human serum albumin-tris-malonic acid [C<sub>60</sub>]fullerene complex. *Bioconjug. Chem.*, 2005; 16(5): 1058-1062.
59. Bosi S., Da Ros T., Spalluto G., Prato M. Fullerene derivatives: an attractive tool for biological applications. *Eur. J. Med. Chem.*, 2003, 38:913-923.
60. Mashino T., Okuda K., Shimotohno K., Ikegami N., Nishikawa D., Takahashi K., Nakamura S. Human immunodeficiency virus-reverse transcriptase inhibition and hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase inhibition activities of fullerene derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2005, 15(4):1107-1109.
61. Ganser-Pornillos B.K., Yeager M., Sundquist W.I. The structural biology of HIV assembly. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2008, 18(2):203-217.
62. Mashino T., Okuda K., Hirota T., Hirobe M., Nagano T., Mochizuki M. Inhibition of *E. coli* growth by fullerene derivatives and inhibition mechanism. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1999; 9(20): 2959-2962.
63. Tsao N. In vitro action of carboxyfullerene / N. Tsao [et al.] // *J. Antimicrobial Chemother.* - 2002. - Vol. 49. - P. 641-649.
64. Bosi S., Da Ros T., Spalluto G. et al. A new multi- charged C<sub>60</sub> derivative: synthesis and biological properties // *Eur. J. Org. Chem.* 2002. Vol. 17. P. 2928-2934
65. Halliwell B. 1992. Reactive oxygen species and the central nervous system *J Neurochem*, 59:1609-23.

66. Lin A. M., Chyi BY, Wang SD, et al. 1999. Carboxyfullerene prevents iron-induced oxidative stress in rat brain. *J Neurochem*, 72:1634–40.
67. Подольский И. Я., Кондратьева Е. В., Щеглов И. В., Думпис М. А., Пиотровский Л. Б. Аддукт фуллерена C<sub>60</sub> с поливинилпирролидоном предупреждает нарушение формирования долговременной памяти. *Физика твердого тела*, 2002; 44(3): 552-553.
68. Podolski I.Y., Podlubnaya Z.A., Kosenko E.A., Mugantseva E.A., makarova E.G. Effects of hydrated forms of C<sub>60</sub> fullerene on amyloid 1-peptide fibrillization in vitro and performance of the cognitive task. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2007, 7(4-5): 1479-1485.
69. Lin AMY, Fang SF, Lin SZ, et al. 2002. Local carboxyfullerene protects cortical infarction in rat brain. *Neurosci Res*, 43:317–21
70. Krustic P. J., Wasserman E., Keizer P. N. et al. Radical reactions of C<sub>60</sub> // *Science*. 1991. Vol. 254. P. 1183–1185.
71. Wolf D., Papoiu A., Mialkowski K., Richardson C., Schuster D., Wilson S. Inhibition of nitric oxide synthase isoform by tris-malonil-C<sub>60</sub>-fullerene adducts. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2000; 378: 216-223.
72. Hu Z., Guan W., Wang W., Huang L., Xing H., Zhu Z. Protective effect of a novel cystine C(60) derivative on hydrogen peroxide-induced apoptosis in rat pheochromocytoma PC12 cells. *Chem. Biol. Interact.*, 2007. 167(2): 135-144.
73. Gharbi N, Pressac M, Hadchouel M, et al. 2005. [60]Fullerene is a powerful antioxidant in vivo with no acute or subacute toxicity. *Nano Lett*, 5:2578–85
74. Slater T. F., Cheeseman K. H., Ingold K. U. 1985. Carbon tetrachloride toxicity as a model for studying free-radical mediated liver injury. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 311:633–45.
75. Foley S, Crowley C, Smaih M, et al. 2002. Cellular localisation of a water-soluble fullerene derivative. *Biochem Biophys Res Commun*, 294:116–19.
76. Youle RJ, Karbowski M. 2005. Opinion: mitochondrial fission in apoptosis. *Nature Rev Mol Cell Biol*, 6:657–63.
77. Tsai MC, Chen YH, Chiang LY. 1997. Polyhydroxylated C<sub>60</sub>, fulleranol, a novel free-radical trapper, prevented hydrogen peroxide- and cumene hydroperoxide-elicited changes in rat hippocampus in vitro. *J Pharm Pharmacol*, 49:438–45.
78. Lotharius J, Dugan LL, O'Malley KL. 1999. Distinct mechanisms underlie neurotoxin-mediated cell death in cultured dopaminergic neurons. *J Neurosci*, 19:1284–93.

79. Bisaglia M, Natalini B, Pellicciari R, et al. 2000. C3-fullero-trismethanodicarboxylic acid protects cerebellar granule cells from apoptosis. *J Neurochem*, 74:1197–204.
80. Xiao L., Takada H., Maeda K. et al. Antioxidant effects of water-soluble fullerene derivatives against ultraviolet ray or peroxy lipid through their action of scavenging the reactive oxygen species in human skin keratinocytes. *Biomed Pharmacotherapy* 2005; 59:351–8.
81. Chen Y. W., Hwang K. C., Yen C., Lai Y. Fullerene derivatives protect against oxidative stress in RAW 264.7 cells and ischemia-reperfused lungs. *Amer. J. Physiol.: Regul. Integr. Compar. Physiol.*; 2004, 287(1):R21–R26.
82. Straface E, Natalini B, Monti D, et al. 1999. C3-Fullero-tris-methanodicarboxylic acid protects epithelial cells from radiation-induced anoikia by influencing cell adhesion ability. *FEBS Lett*, 454:335–40
83. Monti D, Moretti L, Salvioli S, et al. 2000. C60 carboxyfullerene exerts a protective activity against oxidative stress-induced apoptosis in human peripheral blood mononuclear cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 277:711–17.
84. Xiao L, Takada H, Gan XH, et al. 2006. The water-soluble fullerene derivative ‘Radical Sponge’ exerts cytoprotective action against UVA irradiation but not visible-light-catalyzed cytotoxicity in human skin keratinocytes. *Bioorg Med Chem Lett*, 16:1590–5.
85. Chueh S. C., Lai M. K., Lee M. S., Chiang L. Y., Ho T. I., and Chen S. C. Decrease of free radical level in organ perfusate by a novel water-soluble carbon-sixty, hexa(sulfobutyl)fullerenes. *Transplantation Proceedings*, 1999, 31(5):1976–1977.
86. Yang D.Y., Wang M. F., Chen I. L., Chan Y. C., Lee M. S., Cheng F. C. Systemic administration of water-soluble hexasulfonated C<sub>60</sub> (FC<sub>4</sub>S) reduces cerebral ischemia-induced infarct volume in gerbils. *Neurosci. Lett.*, 2001; 311(2): 121-124.
87. Сыренский А. В., Галагудза М. М., Егорова Е. И. Предпосылки к изучению сердечно-сосудистых эффектов производных фуллерена (литературный обзор). *Артериальная гипертензия*, 2004,10.
88. Lai Y. L., Murugan P., Hwang K. C. Fullerene derivative attenuates ischemia-reperfusion-induced lung injury. *Life Sci.*, 2003; 72(11): 1271-1278.
89. Yamakoshi Y., Sueyoshi S., Miyata N. Biological activity of photoexcited fullerene. *Kokuritsu Iyakuhin Shokuhin Eisei Kenkyusho Hokoku*, 1999; 117: 50-60.
90. Mizuseki H., Igarashi N., Belosludov R. V., Farajian A. A., Kawazoe Y. Theoretical study of chlorin-fullerene supramolecular complexes for photovoltaic devices. *Jpn. J. Appl. Phys.*, 2003; 42/4B: 2503-2505.

91. Alvarez M. G, Prucca C., Milanesio M. E., Durantini E. N., Rivarola V. Photodynamic activity of a new sensitizer derived from porphyrin-C<sub>60</sub> dyad and its biological consequences in a human carcinoma cell line. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 2006; 38(12): 2092-2101.
92. Орлова М.А., Трофимова Т.П., Орлов А.П., Шаталов О.А., Наполов Ю.К., Свистунов А.А., Чехонин В.П. Фуллерены и апоптоз. Новые направления медицинской науки. *Онкогематология*, 2013, 1, 65-71.
93. Каркищенко Н.Н. Нанобезопасность: новые подходы к оценке рисков и токсичности наноматериалов. *Биомедицина* 2009;1:5–27.
94. Nishimura T., Kubota R., Tahara M. et al. Biological effects of fullerene C<sub>60</sub> in mouse embryonic stem cells. *Toxicol Lett*; 2006:164S:S214
95. Scrivens W. A., Tour, J. M., Creek, K. E., Pirisi L. Synthesis of C<sup>14</sup>-labeled C<sub>60</sub>, its suspension in water, and its uptake by human keratinocytes. *J. Am. Chem. Soc.*; 1994, 116: 4517-4518.
96. Ye C., Chen C. Y., Chen Z., Meng H., Xing L., Yuan H., Xing G. M., Zhao F., Zhao Y. L., Chai Z. F. In situ observation of C<sub>60</sub>C(COOH)<sub>2</sub> interacting with living cells using fluorescent microscopy. *Chin. Sci. Bull.*, 2006; 51: 1060-1064.
97. Li W., Chen C., Ye C., Wei T., Zhao Y., Lao F., Chen Z., Meng H., Gao Y., Yuan H., Xing G., Zhao F., Chai Z., Zhang X., Yang F., Han D., Tang X., Zhang Y. The translocation of fullerene nanoparticles into lysosome via the pathway of clathrin-mediated endocytosis. *Nanotechnology*, 2008, doi:10.1088/0957-4484/19/14/145102.
98. Yang J., Wang K., Driver J., Yang J., Barron A. R. The use of fullerene substituted phenylalanine amino acids as a passport for peptides through cell membranes. *Org. Biomol. Chem.*, 2007; 5: 280-266.
99. Andreev I., Petrukhina A., Garmanova A., Andreev S., Romanova V., Troshin P., Troshina O., DuBuske L. Penetration of fullerene C<sub>60</sub> derivatives through biological membranes. *Fullerenes, Nanotubes, and Carbon Nanostructures*, 2008; 16: 89-102.
100. Benyamini H., Shulman-Peleg A., Wolfson H. J., Belgorodsky B., Fadeev L., Gozin M. Interaction of C<sub>60</sub>-fullerene and carboxyfullerene with proteins: docking and binding site alignment. *Bioconjugate Chem.*, 2006; 17: 378-386.
101. Weber U., Rettig H. The use of carbon as manufacturing material of endoprotheses. *Z. Orthop. Ihre Grenzgeb.*, 1979; 117: 268-276.
102. Chen B. X., Wilson S. R., Das M., Coughlin D. J., and Erlanger B. F., "Antigenicity of fullerenes: antibodies specific for fullerenes and their characteristics,"



Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 95, no. 18, pp. 10809–10813, 1998.

103. Braden B. C., Goldbaum F. A., Chen B. X., Kirschner A. N., Wilson S. R., Erlanger B. F. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000; 97(22): 12193-12197.

104. Масалова О. В., Шепелев А. В., Атанадзе С. Н., Парнес З. Н., Романова В. С., Вольпина О. М., Семилетов Ю. А., Куц А. А. Иммуностимулирующее действие водорастворимых производных фуллерена — перспективных адъювантов для вакцин нового поколения. Докл. РАН, 1999; 369(3): 411-413.

105. Ryan J. J., Bateman H. R., Stover A. et al., “Fullerene nanomaterials inhibit the allergic response,” Journal of Immunology, vol. 179, no. 1, pp. 665–672, 2007.

106. Magoulas G. E., Garnelis T., Athanassopoulos C. M et al., “Synthesis and antioxidative/anti-inflammatory activity of novel fullerene-polyamine conjugates,” Tetrahedron, vol. 68, no. 35, pp. 7041–7049, 2012.

107. Yudoh K., Karasawa R., Masuko K., and Kato T., “Water-soluble fullerene (C60) inhibits the development of arthritis in the rat model of arthritis,” International Journal of Nanomedicine, vol. 4, pp. 217–225, 2009.

108. Park E.-J., Kim H., Kim Y., Yi J., Choi K., and Park K. Carbon fullerenes (C60s) can induce inflammatory responses in the lung of mice. Toxicology and Applied Pharmacology, 2010, 244(2):226–233.

109. Bunz H., Plankenhorn S., and Klein R., “Effect of buckminsterfullerenes on cells of the innate and adaptive immune system: an in vitro study with human peripheral blood mononuclear cells,” International Journal of Nanomedicine, vol. 7, pp. 4571– 4580, 2012.

110. Babakhin A.A., Andrievsky G., DuBuske L.M. Inhibition of systemic and passive cutaneous anaphylaxis by water-soluble fullerene C<sub>60</sub>. The Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2009, 123(2), S118

111. Башкатова Е.Н., Андреев С.М., Шершакова Н.Н., Бабахин А.А., Шиловский И.П., Хайтов М.Р. Изучение модулирующей активности производных фуллерена C<sub>60</sub> на реакцию гиперчувствительности замедленного типа. Физиология и патология иммунной системы, 2012, №2, 17-27.

112. Arbogast J. W., Foote C. S. Photophysical properties of C<sub>70</sub>. J. Am. Chem. Soc., 1991; 113: 8886-8891

113. Tokuyama H., Yamago S., Nakamura E., Shiraki T., Sugiura Y. Photoinduced biochemical activity of fullerene carboxylic acid. J. Am. Chem. Soc., 1993; 115: 7918-7919.

114. Guldi D. M., Prato M. Excited-state properties of C<sub>60</sub> fullerene derivatives. Acc. Chem. Res., 2000; 32: 695-703

115. Tabata Y., Murakami Y., Ikada Y. Antitumor effect of poly(ethylene glycol)-modified fullerene. *Fullerene Sci. Technol.*, 1997A; 5: 989-1007.
116. Tabata Y., Murakami Y., Ikada Y. Photodynamic effect of polyethylene glycol-modified fullerene on tumor. *Jpn. J. Cancer Res.*, 1997; 88: 1108-1116.
117. Tabata Y., Ikada Y. Biological function of fullerene. *Pure Appl. Chem.*, 1999; 71(11): 2047-2053.
118. Андреев С.М., Лаптев В.П., Панферова Н.Г., Романова В.С., Петров В.В., Овчинников А.Е. Фармацевтическая композиция для фотодинамической терапии и способ лечения онкологического заболевания с ее использованием. Патент РФ №4343722 (26.12. 2005).
119. Huy P.D., Li M.S. Binding of fullerenes to amyloid beta fibrils: size matters. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2014, 16(37):20030-20040.
120. Xie L., Luo Y., Lin D., Xi W., Yang X., Wei G. The molecular mechanism of fullerene-inhibited aggregation of Alzheimer's  $\beta$ -amyloid peptide fragment. *Nanoscale*, 2014, 6(16):9752-9762.
121. Podolski I.Ya., Podlubnaya Z.A., Kosenko E.A., Mugantseva E.A., Makarova E.G., Marsagishvili L.G., Shpagina M.D., Kaminsky Yu.G., Andrievsky G.V., Klochkov V.K.. Effects of hydrated forms of C<sub>60</sub> fullerene on amyloid beta-peptide fibrillization in *VITRO* and performance of the cognitive task. *J. of Nanosci. Nanotech.*, 2007, 7(4-5):1479-1485.
122. Tong, J., Zimmerman, M. C., Li, S., Yi, X., Luxenhofer, R., Jordan, R., & Kabanov, A. V. (2011). Neuronal uptake and intracellular superoxide scavenging of a fullerene (C<sub>60</sub>)-poly(2-oxazoline)s nanoformulation. *Biomaterials*, 32(14), 3654–3665. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.01.068
123. Фалынскова И.Н., Ионова К.С., Дедова А.В., Ленева И.А., Махмудова Н.Р., Раснецов Л.Д. Противовирусное действие гидрата фуллерен(трис-аминокапроновой кислоты) в культуре клеток HEp-2 в отношении респираторно-синцитиального вируса. *Химико-фармацевтический журнал*, 2014.-N 2.-С.17-20.
124. Белоусова И.М., Данилов О.Б., Муравьева Т.Д., Кисляков И.М., Рыльков В.В., Крисько Т.К., Киселев О.И., Зарубаев В.В., Пиотровский Л.Б. Твердофазные фотосенсибилизаторы на основе фуллерена C<sub>60</sub> для фотодинамической инактивации вирусов в биологических жидкостях. *Оптический журнал*, 2009, т.76, №4, с.97-107.
125. Yudoh K., Karasawa R., Masuko K., Kato T. Water-soluble fullerene (C<sub>60</sub>) inhibits the development of arthritis in the rat model of arthritis. *Int. J. Nanomedicine*, 2009, 4:217-225.

126. Kotelnikova R. A., Smolina A. V., Grigoryev V. V., Faingold I. I., Mischenko D. V., Rybkin A. Yu., Poletayeva D. A., Vankin G. I., Zamoyskiy V. L., Voronov I. I., Troshin P. A., Kotelnikova A. I., Bachurin S. O. Influence of water-soluble derivatives of [60]fullerene on therapeutically important targets related to neurodegenerative diseases. *Med. Chem. Commun.*, 2014, 5, 1664–1668.
127. Ilinskaya A.N., Dobrovolskaia V.A. Immunosuppressive and anti-inflammatory properties of engineered nanomaterials. *Br. J. Pharmac.*, 2014, 171(17):3988-4000.
128. Jiao Q., Li L., Mu Q., Zhang Q. Immunomodulation of nanoparticles in nanomedicine applications. *Biomed. Res. Int.*, 2014:426028. doi: 10.1155/2014/426028.
129. Liu Y., Jiao F., Qiu Y., Li W., Qu Y., Tian Ch., Li Y., Bai R., Lao F., Zhao Y., Chai Z., C.Chen. Immunostimulatory properties and enhanced TNF- $\alpha$  mediated cellular immunity for tumor therapy by C60(OH)<sub>20</sub> nanoparticles. *Nanotechnology*, 2009,20(41):415102. doi: 10.1088/0957-484/20/41/415102.
130. Chen Z., Ma L., Liu Y., Chen C. Applications of functionalized fullerenes in tumor theranostics. *Theranostics*, 2012, 2(3):238-250.
131. Radic S., Nedumpully-Govindan P., Chen R., Salonen E., Brown J.M., Ke P.C., Ding F. Effect of fullerenol surface chemistry on nanoparticle binding-induced protein misfolding. *Nanoscale*, 2014, 6(14):8340-8349.
132. Santos S.M., Dinis A.M., Peixoto F., Ferreira L., Jurado A.S., Videira R.A. Interaction of fullerene nanoparticles with biomembranes: from the partition in lipid membranes to effects on mitochondrial bioenergetics. *Toxicol. Sci.*, 2014,138(1):117-129.
133. Lucafò M., Gerdol M., Pallavicini A., Pacor S., Zorzet S., Da Ros T., Prato M., Sava G. Profiling the molecular mechanism of fullerene cytotoxicity on tumor cells by RNA-seq. *Toxicology*, 2013, 314(1):183-192.
134. Ye S., Chen M., Jiang Y., Chen M., Zhou T., Wang Y., Hou Z., Ren L. Polyhydroxylated fullerene attenuates oxidative stress-induced apoptosis via a fortifying Nrf2-regulated cellular antioxidant defence system. *Int. J. Nanomed.*, 2014, 9:2073-2087.
135. Skamrova G.B., Laponogov I., Buchelnikov A.S., Shckorbatov Y.G., Prylutska S.V., Ritter U., Prylutskiy Y.I., Evstigneev M.P. Interceptor effect of C60 fullerene on the in vitro action of aromatic drug molecules. *Eur. Biophys. J.*, 2014, 43(6-7):265-276.
136. Andreichenko K.S., Prylutska S.V., Medynska K.O., Bogutska K.I., Nurishchenko N.E., Prylutskiy Y.I., Ritter U., Scharff P. Effect of fullerene C60 on ATPase activity and superprecipitation of skeletal muscle actomyosin. *Ukr. Biochim. J.*, 2013,85(2):20-26.

137. Dellinger A.L., Zhou Z., Kepley C.L. A steroid-mimicking nanomaterial that mediates inhibition of human lung mast cell responses. *Nanomedicine*. 2014,10(6):1185-1193.
138. Inui S., Aoshima H., Nishiyama A., Itami S. Improvement of acne vulgaris by topical fullerene application: unique impact on skin care. *Nanomedicine*, 2011, 7(2):238-241.
139. Zhou Z. Liposome formulation of fullerene-based molecular diagnostic and therapeutic agents. *Pharmaceutics*, 2013, 5, 525-541.
140. Nierengarten I., Nierengarten J.F. Fullerene sugar balls: a new class of biologically active fullerene derivatives. *Chem Asian J.*, 2014, 9(6):1436-1444.
141. Bunz H., Plankenhorn S., Klein R. Effect of buckminsterfullerenes on cells of the innate and adaptive immune system: an in vitro study with human peripheral blood mononuclear cells. *Int. J. Nanomed.*, 2012,7:4571-4580.
142. Norton S.K., Dellinger A., Zhou Z., Lenk R., Macfarland D., Vonakis B., Conrad D., Kepley C.L. A new class of human mast cell and peripheral blood basophil stabilizers that differentially control allergic mediator release. *Clin. Transl. Sci.*, 2010, 3(4):158-169.
143. Xu Y., Zhu J., Xiang K., Li Y., Sun R., Ma J., Sun H., Liu Y. Synthesis and immunomodulatory activity of [60]fullerene-tuftsins conjugates. *Biomaterials*, 2011, 32(36):9940-9949.
144. Амиршахи Н. Порфириин-фуллереновые наночастицы РМС16 в коррекции митохондриальных дисфункций, индуцированных в клетках миокарда крыс 1-метилникотинамидом. Кандидатская диссертация (канд. фармакол. наук), 2008.
145. Miao Y., Xu J., Shen Y., Chen L., Bian Y., Hu Y., Zhou W., Zheng F., Man N., Shen Y., Zhang Y., Wang M., Wen L. Nanoparticle as signaling protein mimic: robust structural and functional modulation of CaMKII upon specific binding to fullerene C60 nanocrystals. *ACS Nano*, 2014, 8(6):6131-6144.
146. Magoulas G.E., Bantzi M., Messari D., Voulgari E., Gialeli C., Barbouri D., Giannis A., Karamanos N.K., Papaioannou D., Avgoustakis K. Synthesis and Evaluation of Anticancer Activity in Cells of Novel Stoichiometric Pegylated Fullerene-Doxorubicin Conjugates. *Pharm Res*. 2014, Nov 8. (in print).
147. Kwag DS, Park K, Oh KT, Lee ES. Hyaluronated fullerenes with photoluminescent and antitumoral activity. *Chem Commun (Camb)*, 2013, 49(3):282-284.
148. Leavens T.L., Xia X.R., Lee H.A., Monteiro-Riviere N.A., Brooks J.D., Riviere J.E. Evaluation of perfused porcine skin as a model system to quantitate tissue distribution of fullerene nanoparticles. *Toxicol. Lett.*, 2010, 197(1):1-6.

149. Huy P.D., Li M.S. Binding of fullerenes to amyloid beta fibrils: size matters. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2014, 16(37):20030-20040.